

## LA SINDROME DELL'X FRAGILE: RECENTI ACQUISIZIONI E PROSPETTIVE FUTURE

SERENA VATTA, ELENA BEVILACQUA, ANNA BELGRANO, MARCELLO MORGUTTI, ANTONIO AMOROSO

Servizio di Genetica, IRCCS "Burlo Garofolo", Trieste

Cattedra di Genetica, Dipartimento di Scienze della Riproduzione e dello Sviluppo, Università di Trieste

La sindrome dell'X fragile, o sindrome di Martin Bell, è una delle cause più frequenti di ritardo mentale di tipo ereditario, in quanto interessa 1 maschio ogni 4000 e una femmina ogni 8000<sup>1</sup>. Alcuni dati indicano che circa il 10% di tutti i ritardi mentali e circa la metà dei ritardi mentali nei maschi siano da attribuire a tale sindrome.

Si tratta di una malattia X-linked dominante a penetranza incompleta (80% nei maschi e 30% nelle femmine), associata a un sito fragile, chiamato FRAXA, che si esprime a livello della parte terminale del braccio lungo del cromosoma X, in Xq27.3.

### CARATTERISTICHE CLINICHE

Il fenotipo è particolarmente sfumato nel neonato e nella prima infanzia. Gli unici segni indicativi possono essere un eccesso ponderale, macrocrania relativa

e ipotonia muscolare. Con la crescita il bambino può presentare alterazioni del comportamento (come iperattività e difetti dell'attenzione), manifestazioni motorie ripetitive, deficit del linguaggio e ritardo mentale, che di solito è di grado medio-severo (QI compreso tra 60 e 20). Talvolta sono stati descritti comportamenti autistici ed episodi convulsivi.

Nel giovane e nell'adulto la diagnosi clinica è facilitata dalla comparsa di tratti fenotipici caratteristici, come la tendenza all'alta statura, ma macrocrania, il viso lungo con fronte larga e mandibola prominente, ipotelorismo, palato ogivale, padiglioni auricolari ampi (Figura 1).

Nelle femmine il fenotipo è poco espresso a livello fisiognomico, ed è caratterizzato solo dal difetto mentale.

La displasia connettivale può essere causa di iperlassità legamentosa, cute iperelastica, e frequentemente di prolapsio della valvola mitralica.

Dopo la pubertà si rende evidente il

macrorchidismo (volumi testicolari tra 30 e 100 ml), non sempre collegato a infertilità.

### BASI MOLECOLARI E MODALITÀ DI TRASMISSIONE

Le basi molecolari della sindrome dell'X fragile sono state comprese con la scoperta e la caratterizzazione del gene FMR-1 (Fragile X Mental Retardation 1).

La malattia infatti è dovuta a una massiva espansione di triplette CGG (le "traversine" della catena del DNA) nella porzione 5' non tradotta di questo gene, che tende a modificarsi nel passaggio da una generazione all'altra<sup>2,5</sup>.

Le mutazioni di questo tipo sono state definite mutazioni dinamiche.

FMR-1 è un gene di circa 38 kb altamente conservato e consiste di 17 esoni<sup>6,7</sup> (Figura 2). Nei soggetti normali il numero di ripetizioni delle triplette CGG è polimorfico, e varia tra 6 e 50. L'allele più comune è rappresentato da 30 repeats, cioè da 30 triplette ripetute, e viene trasmesso in forma stabile.

La sequenza di triplette CGG è normalmente interrotta dalla presenza di triplette AGG, che sembrano avere un ruolo nel mantenere la stabilità di questa regione<sup>8,12</sup>.

I soggetti affetti presentano una notevole amplificazione della regione ripetuta, superiore a 200-230 repeats, che si accompagna a metilazione di quasi tutte le citosine della sequenza stessa e dell'isola CpG a livello del promotore (metilazione completa).

La metilazione di tutte queste triplette sopprime la trascrizione del gene e determina l'assenza della proteina FMRP, che è la proteina codificata dal gene FMR-1, la cui assenza condiziona la sindrome, con comparsa dei segni e dei sintomi della malattia.

Ci sono dei maschi che, pur presentando un aumento di triplette compreso nell'ambito della mutazione completa, non presentano ipermetilazione, e di conseguenza non manifestano la sintomatologia. Questi soggetti con mutazio-



Figura 1. Malgrado la non perfetta riproduzione delle foto, è riconoscibile in questi bambini un'aria di famiglia, che li fa, soprattutto quando sono ancora piccoli, non troppo diversi dai compagni "sani". I soggetti con sindrome dell'X fragile presentano un viso stretto e allungato, con tendenza alla macrocrania, fronte ampia, prognatismo, ipoplasia della regione malare, padiglioni auricolari ampi e spesso sporgenti, ipotelorismo.

ne completa non possono essere quindi diagnosticati con il solo esame clinico.

## IL PORTATORE SANO

La sindrome dell'X fragile è caratterizzata dalla presenza di un numero elevato di portatori e portatrici sani.

A livello molecolare questi presentano la cosiddetta premutazione, che consiste in un'espansione delle triplette CGG compresa tra 50 e 200 (in confronto alle 30 normali).

In questi soggetti l'ipermetilazione è assente, e i livelli della proteina FMRP sono normali.

Tuttavia la regione che caratterizza la premutazione è estremamente instabile, e l'instabilità aumenta esponenzialmente con l'aumentare del numero delle triplette da 65 a 100<sup>13</sup>.

Questo fenomeno, detto fenomeno dell'anticipazione o paradosso di Sherman, si traduce con un aumento del numero dei soggetti affetti con il passare delle generazioni nelle famiglie caratterizzate da X fragile (Figura 3). Una possibile spiegazione dell'aumentata instabilità delle triplette espanse può essere la perdita delle AGG che interrompono la sequenza di CGG repeats<sup>14,15</sup>.

L'espansione da una premutazione a una premutazione più estesa o a una "full mutation" avviene solamente attraverso la trasmissione materna<sup>16</sup>. Si è visto infatti che padri premutati possono trasmettere alle figlie solamente una premutazione talvolta più grande di quella paterna, ma mai una mutazione completa. Potrebbe trattarsi di un fenomeno

di imprinting, che protegge i cromosomi mutati paterni a livello meiotico e/o post-zigotico da eccessive espansioni.

Non sono rari i fenomeni di mosaicismi di espansione. In effetti, circa il 15% dei soggetti affetti mostrano dei quadri complessi in cui coesistono, nei diversi tessuti, gradi di espansione diversi, che si estendono dal range della premutazione alla full mutation. Questo indica che l'amplificazione, oltre che nelle cellule in meiosi, può avvenire anche durante lo sviluppo somatico.

Sono stati descritti anche mosaicismi di metilazione. Alcuni soggetti, definiti "high functioning", presentano infatti degli alleli che non sono metilati, sebbene abnormemente espansi. L'assenza della metilazione permette la trascrizione del gene, che potrà quindi essere espresso in normale proteina FMRP.

Queste ultime osservazioni indicano che la quantità di questa proteina nei tessuti non è legata esclusivamente allo stato di metilazione, ma che anche il grado di espansione delle triplette può influenzare la sua espressione.

Si è visto, infatti, che trascritti con espansioni estese non vengono tradotti in modo corretto<sup>17</sup>.

## LA PROTEINA FMRP

La proteina FMRP, codificata dal gene FMR-1, viene espressa non solo nel cervello, ma anche in altri tessuti come testicoli, ovaie, epitelio esofageo, timo, milza e, a un livello inferiore, nel colon, utero, tiroide e fegato<sup>18</sup>. È particolarmente

abbondante nei neuroni dell'ippocampo e dello strato granulare del cervelletto.

L'analisi della sequenza aminoacidica (Figura 2) rivela verso il centro della proteina una coppia di una sequenza di 30 aminoacidi, chiamata HK domain (K homology domain), e verso l'estremità carbossilica un cluster di arginine e glicine che costituisce la cosiddetta RGG box<sup>19,20</sup>. Queste sequenze sono proprie delle proteine che interagiscono con gli RNA, e infatti si è visto che FMRP si lega selettivamente a RNA messaggeri espressi nel cervello umano e ai ribosomi.

FMRP possiede inoltre un segnale di localizzazione nucleare (NSL) e un segnale di esportazione nucleare (NES) che fanno ipotizzare che la proteina possieda un ciclo vitale a spoletta fra nucleo e citoplasma (Figura 2)<sup>21</sup>. Si presume che dal citoplasma la proteina entri nel nucleo grazie a NSL, dove si lega agli mRNA. La ribonucleoproteina così formata, per la presenza di NES, può passare nel citoplasma e associarsi ai ribosomi. Queste funzioni sembrano avere grande importanza soprattutto nei neuroni, dove dendriti e assone sono distanti dal nucleo della cellula. L'intervento di FMRP consentirebbe di avere mRNA già posizionati sui ribosomi in modo che la cellula possa sintetizzare in periferia le proteine necessarie per una risposta neuronale adeguata e veloce<sup>22</sup>.

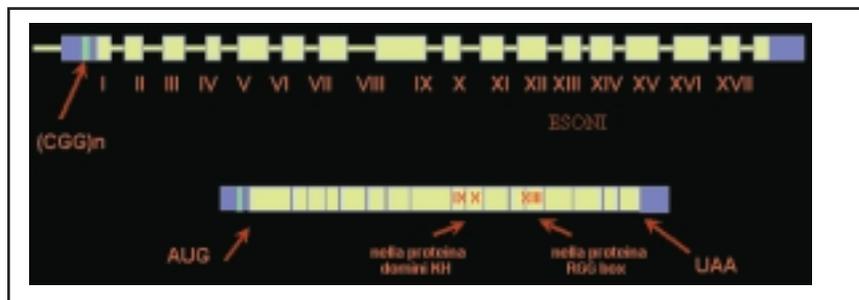


Figura 2. Rappresentazione schematica del gene FMR-1 e del suo trascritto. Il gene è lungo 38 kb ed è formato da 17 esoni (rappresentati da altrettanti quadrati). Nel primo esone, a livello della regione 5' non tradotta (5' UTR), è presente la sequenza polimorfica delle ripetizioni CGG, la cui espansione è legata alla malattia. L'RNA messaggero (o mRNA, che nella figura risulta composto solo dalla parte codificante dell'informazione genetica) viene tradotto nella proteina FMRP. Il primo aminoacido di questa, la metionina, è codificato dalla tripletta di inizio traduzione AUG. La tripletta UAA è il segnale di stop traduzione. Verso il centro sono schematizzati i due domini HK e, all'estremità carbossilica, una regione ricca di arginine e glicine, detta RGG box.

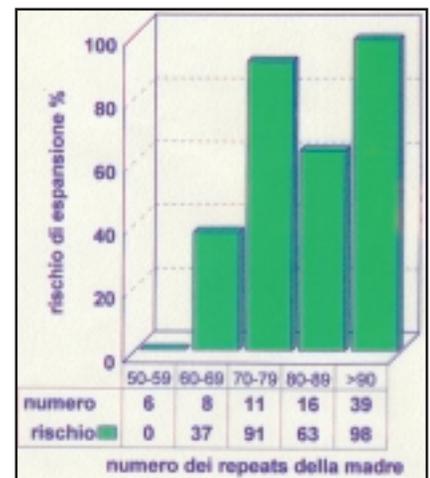


Figura 3. La probabilità di espansione del numero di triplette dal range della normalità a quello di premutazione e da questo a mutazione completa aumenta con il numero di CGG presenti nella madre. In caso di premutazione della madre, il rischio di mutazione completa nella prole varierà a seconda del numero di ripetizioni presenti nella madre: tra 50 e 60 sarà minimo, tra 90 e 100 sarà quasi certo.



Figura 4. La metafase mostra il sito FRAXA, legato alla sindrome dell'X fragile, a livello della parte terminale del braccio lungo del cromosoma X, e un sito fragile del cromosoma 6. I due siti fragili si presentano come una rottura che può interessare uno o entrambi i cromatidi, e possono essere distinti esclusivamente con la tecnica del bandeggio dei cromosomi.

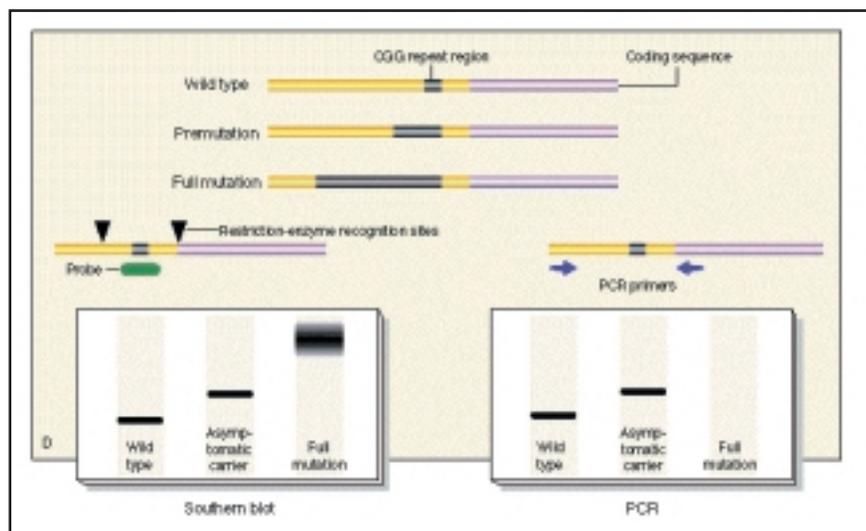


Figura 5. Il Southern blotting e la PCR sono le due tecniche utilizzate per la diagnosi molecolare della sindrome dell'X fragile. Entrambe consentono di evidenziare l'amplificazione della regione ripetuta.

I risultati del Southern blotting sono schematizzati in basso a sinistra. Questa tecnica richiede l'utilizzo di enzimi di restrizione che tagliano il DNA, e l'uso di una sonda marcata che riconosca la regione ripetuta. La metodica permette di distinguere tanto la premutazione (stato di portatore sano) quanto la mutazione completa. Questa è in relazione con le dimensioni dei frammenti che migrano in un campo elettroforetico in modo diverso a seconda della loro lunghezza.

La PCR, i cui risultati sono schematizzati in basso a destra, permette di amplificare la regione ripetuta utilizzando dei primers che la fiancheggiano. Anche in questo caso il risultato è una banda che migra in un campo elettroforetico in modo diverso a seconda dei CGG repeats. Questa tecnica, più veloce e più precisa per quanto riguarda la determinazione del numero delle triplette, non permette di ottenere il prodotto di amplificazione nel caso di mutazione completa quando la regione molto ricca in CG diventa troppo estesa da consentire alla DNA polimerasi di lavorare in modo corretto.

## DIAGNOSI DI LABORATORIO

Fino al 1991, anno in cui si sono identificati il gene FMR-1 e le mutazioni responsabili della malattia, la sindrome dell'X fragile veniva diagnosticata con tecniche citogenetiche. Queste tecniche permettono di evidenziare il sito fragile (FRAXA) a livello della parte terminale del braccio lungo del cromosoma X in corrispondenza della banda q27.3. FRAXA è un sito fragile, sensibile alla carenza di folato, che si esprime quindi nelle metafasi di cellule coltivate in terreni privi di acido folico e si manifesta come una costrizione o una piccola interruzione del cromosoma (Figura 4).

Il FRAXA si evidenzia solamente nei soggetti affetti, e viene riscontrato nel 10-50% delle metafasi di questi soggetti. Sembra che la base molecolare della formazione di questo sito fragile sia l'ipermetilazione dell'isola CpG. L'ipermetilazione sarebbe responsabile della replicazione tardiva del DNA in Xq27.3 che predisporrebbe il cromosoma a manifestare il sito fragile.

Attualmente la diagnostica citogenetica è stata abbandonata in quei laboratori dove sono in uso tecniche di biologia molecolare, soprattutto perché questa metodica non consente di identificare i portatori sani, e anche perché recentemente è stato individuato un altro sito raro, sensibile al folato, il FRAXE, che si esprime in stretta vicinanza al FRAXA, e che può facilmente essere fonte di errori diagnostici.

La diagnostica molecolare prevede l'utilizzo di due tecniche: PCR (Polymerase Chain Reaction) e Southern blotting (Figura 5). Delle due tecniche la seconda presenta maggiori vantaggi.

Mediante PCR è possibile amplificare la regione che comprende le sequenze CGG ripetute del gene FMR-1. Gli amplificati vengono evidenziati mediante corsa elettroforetica su gel di agarosio. Se però il numero dei repeats è superiore a 100, non si ottengono prodotti di amplificazione, in quanto la DNA polimerasi non riesce a "copiare" frammenti di DNA così ricchi in CG. Con la PCR, pertanto, si riescono a definire solamente la condizione di normalità o le piccole premutazioni. Inoltre, la sola analisi mediante PCR potrebbe essere causa di errori diagnostici nei "mosaici" in cui l'allele normale o gli alleli premutati possono essere amplificati normalmente anche in presenza di mutazione completa. Il mosaicismo cellulare è espressione dell'instabilità della mutazione a livello mitotico.

L'analisi di Southern blotting, pur non essendo molto precisa per quanto riguarda la determinazione dell'entità dell'espansione di triplette, permette però di individuare sia lo stato di portatore che quello di affetto. Riesce

a definire inoltre tutti i casi di mosaicismo (sia di estensione che di metilazione).

La tecnica prevede la doppia digestione del DNA con due enzimi di restrizione (EcoRI ed EagI), la separazione dei frammenti così ottenuti mediante elettroforesi su gel di agarosio, il trasferimento del DNA su un filtro di nylon e l'ibridazione del filtro con una sonda marcata con fosforo radioattivo (P32). Poiché EagI è sensibile alla metilazione, l'ipermetilazione legata alla mutazione completa non consentirà il taglio dell'enzima al suo sito di restrizione e pertanto il frammento ottenuto, più lungo di quello non metilato, correrà di meno in un campo elettroforetico. Si otterranno frammenti di diversa lunghezza anche nel caso di diverso grado di amplificazione di triplette CGG.

La diagnosi di FRAXA potrà essere quindi effettuata analizzando il tipo e il numero delle bande che sono state identificate dalla sonda marcata con elemento radioattivo, grazie all'esame di una lastra autoradiografica dopo il suo sviluppo. Bisogna tenere presente che, dei due cromosomi X della femmina, uno è sempre inattivato (metilato) anche in condizioni normali, e pertanto il pattern di bande sarà diverso da quello del maschio.

## CONOSCENZE E PROSPETTIVE

La scoperta del gene FMR-1 e delle mutazioni responsabili della sindrome dell'X fragile ha permesso di comprendere molte delle caratteristiche di questa e di altre sindromi dovute a espansione di triplette, come ad esempio il fenomeno dell'anticipazione. Tuttavia alcuni punti non sono stati ancora chiariti. Non è noto, infatti, il momento esatto in cui avviene l'espansione delle triplette, né si sa con esattezza perché la trasmissione della malattia avvenga esclusivamente per via materna. Inoltre la funzione della proteina FMRP non è stata ancora del tutto chiarita.

Da studi su cellule in coltura si è visto che esiste la possibilità di riattivare geni FMR-1 con mutazione completa dopo trattamento demetilante del DNA con 5-azadC, e che i trascritti vengono poi tradotti in proteina normale. Sarebbe pertanto ipotizzabile una riattivazione farmacologica del gene FMR-1 nei pazienti con X fragile. Un trattamento a lungo termine con i farmaci demetilanti finora conosciuti non è pensabile per i pesanti effetti collaterali che questa terapia comporterebbe, ma l'impiego di agenti meno tossici potrebbe rappresentare una futura possibilità per la cura dei pazienti.

È possibile inoltre ipotizzare un trattamento demetilante in epoca prenatale. Si sa che l'ipermetilazione della mutazione completa si verifica in un momento precoce dello sviluppo fetale, attorno alla decima settimana di gestazione. Se l'evento di metilazione potesse essere controllato, il promotore di FMR-1 potrebbe rimanere non metilato anche dopo la nascita.

In attesa che queste o altre strategie terapeutiche possano realizzarsi, al momento attuale è di fondamentale importanza limitare la diffusione della sindrome attraverso l'individuazione dei portatori, la consulenza genetica e la diagnosi prenatale. Nonostante l'alta prevalenza, è probabile che la malattia sia ancora largamente sottodiagnosticata. Questo sembra essere ingiustificato, data la possibilità di analizzare direttamente il gene con le attuali tecniche di biologia molecolare.

## Bibliografia

- Warren ST, Nelson DL. Advance in molecular analysis of fragile X syndrome. *J Am Med Assoc* 1994;271:534-42.
- Kremer EJ, et al. Mapping of DNA instability at the fragile X to a trinucleotide repeat sequence p(CCG)<sub>n</sub>. *Science* 1991;252:1711-4.
- Yu S, et al. Fragile X genotype characterized by an unstable region of DNA. *Science* 1991;252:1179-81.
- Verkerek AJMH, et al. Identification of a gene (FMR-1) containing a CGG repeat coincident with a breakpoint cluster region exhibiting length variation in fragile X syndrome. *Cell* 1991;65:905-14.
- Oberle I, et al. Instability of a 550-base pair DNA segment and abnormal methylation in fragile X syndrome. *Science* 1991;252:1097-102.
- Ashley CT, et al. Human and murine FMR-1: alternative splicing and translational downstream of the CGG-repeat. *Nature Genet* 1993;4:244-51.
- Eichler EE, et al. Fine structure of the human FMR1 gene. *Hum Mol Genet* 1993; 2:1147-53.
- Fu YH, et al. Variation of the CGG repeat at the fragile X site results in genetic instability: resolution of the Sherman paradox. *Cell* 1991;67:1047-58.
- Eichler EE, et al. Length of uninterrupted CGG repeats determines instability in the FMR1 gene. *Nature Genet* 1994;8:88-94.
- Kunst CB, Warren ST. Cryptic and polar variation of the fragile X repeat could result in predisposing normal alleles. *Cell* 1994; 77:853-61.
- Snow K, et al. Analysis of CGG sequence at the FMR1 locus in fragile X families and in the general population. *Am J Hum Genet* 1993;53:1217-28.
- Snow K, et al. Sequence analysis of the fragile X trinucleotide repeat: implications for the origin of the fragile X mutation. *Hum*

## MESSAGGI CHIAVE

- La sindrome dell'X fragile interessa un maschio su 4000 e una femmina su 8000.
- Nel maschio il fenotipo fisico e mentale è facilmente riconoscibile; nella femmina è evidente solo il ritardo mentale.
- La trasmissione avviene solo per via materna.
- L'X fragile è legato a un fenomeno molto particolare, la ripetizione di triplette CGG in un sito del cromosoma X (il sito fragile), e la metilazione di quasi tutte le citosine delle triplette, che le inattiva.
- Nel soggetto normale le triplette variano da sei a cinquanta, nel portatore si arriva a 200-230 ripetizioni. Sopra questa cifra compare la malattia.
- Questa ripetizione cresce da una generazione all'altra, con un aumento progressivo del numero dei malati nelle famiglie colpite.
- La diagnosi si fa oggi con tecniche molecolari, in particolare con il *Southern blotting* che permette di riconoscere anche i portatori.
- Esiste l'ipotesi di una terapia medica, basata su farmaci demetilanti, che potrebbero riattivare le triplette.

*Mol Genet* 1994;3:1543-51.

- Feng Y, et al. Quantitative comparison of FMR1 gene expression in normal and premutation alleles. *Am J Hum Genet* 1995;56:106-13.
- Sherman SL, et al. The marker X syndrome: a cytogenetic and genetic analysis. *Ann Hum Genet* 1984;48:21-37.
- Sherman SL, et al. Further segregation analysis of the fragile X syndrome with special reference to transmitting males. *Hum Genet* 1985;69:289-99.
- Reyniers E, et al. The full mutation of the FMR1 gene of male fragile X patients is absent in their sperm. *Nat Genet* 1993;4:143-6.
- Feng Y, et al. Translational suppression by trinucleotide repeat expansion at FMR1. *Science* 1995;268:731-4.
- Hinds HL, et al. Tissue specific expression of FMR-1 provide evidence for a functional role in fragile X syndrome. *Nature Genet* 1993;3:36-43.
- Ashley JT, et al. FMR1 protein: conserved RNP family domains and selective RNA binding. *Science* 1993;262:563-6.
- Siomi H, et al. The protein product of the fragile X gene, FMR1, has characteristics of an RNA-binding protein. *Cell* 1993;74:298.
- Eberhart DE, et al. The fragile X mental retardation protein is a ribonucleoprotein containing both nuclear localization and nuclear export signals. *Hum Mol Genet* 1996; 5:1083-91.
- Feng Y, et al. Fragile X mental retardation protein: nucleocytoplasmic shuttling and association with somatodendritic ribosomes. *J Neurosci* 1997;17:1539-47.